

1, June 11, 1999, 14:05

1/5/1

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI  
(c)1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010429022

WPI Acc No: 95-330342/199543

XRAM Acc No: C95-146446

XRPX Acc No: N95-248643

Use of recombinant vector encoding specific protein to transform kidney cells - useful for gene therapy, induction of antibodies or protein prodn; also transgenic animals and their urine and transfected cells

Patent Assignee: INST NAT SANTE & RECH MEDICALE (INRM ); INST PASTEUR (INSP )

Inventor: FERRY N; MOULLIER P

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
FR 2717500	A1	19950922	FR 943151	A	19940317	C12P-021/02	199543 B

Priority Applications (No Type Date): FR 943151 A 19940317

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing	Notes	Application	Patent
FR 2717500	A1	38					

Abstract (Basic): FR 2717500 A

Use of a recombinant vector contg. 1 promoter, a nucleic acid sequence (I) encoding a desired protein (II) (including a signal sequence) and a 3'-polyadenylation sequence for transfecting kidney cells in an animal (partic. a mammal) is new. (II) is expressed in these cells and produced in the blood or urine of the animal.

Also new are: (a) a procedure for the prodn. of a heterologous protein in the urine of a mammal comprising: (i) manufacturing a compsn. contg. the vector as above; (ii) placing the compsn. in contact with kidney tubule cells via the renal artery, the ureter or the pyelocaliceal cavity; (iii) the recovery of the urine via a metabolic casing, and (iv) the opt. purification of (II); (b) medication contg. the vector as above, which can be administered to the renal cells of the host; (c) (II) or polypeptides produced in the blood or urine by the transfected cells; (d) non-human animals contg. renal tubule cells carrying the vector; (e) urine contg. (II) produced by these animals; (f) mammalian renal tubule cells contg. the vector, and (g) antibodies (Ab) (monoclonal or polyclonal) directed against an immunogen (IIa) secreted into the circulation by transformed renal cells.

USE - The vectors are partic. used in gene therapy, for immuno-modulation by altering the intravascular concn. of specific proteins, for inducing Ab prodn. or for prodn. of (II) (claimed). Typical (II) are e.g. factor VIII, erythropoietin, cytokines (eg IL-1), plasminogen activator, (I) may also be an antisense sequence that blocks the activity of a cytokine e.g. a transforming growth factor or a platelet derived growth factor (for treating glomerulosclerosis). The Ab are useful for diagnosis and therapy.

ADVANTAGE - Adenovirus vectors can transfect a variety of quiescent kidney cells and can be produced at a high titre. (II) is more easily recovered from urine than from milk. The transfection procedure is easy to perform and treatment can be confined to just one kidney.

Dwg.0/1

Title Terms: RECOMBINATION; VECTOR; ENCODE; SPECIFIC; PROTEIN; TRANSFORM; KIDNEY; CELL; USEFUL; GENE; THERAPEUTIC; INDUCTION; ANTIBODY; PROTEIN; PRODUCE; TRANSGENIC; ANIMAL; URINE; TRANSFECTED; CELL

Derwent Class: B04; D16; P14

International Patent Class (Main): C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A01K-067/027; A61K-039/395; A61K-048/00; C12N-005/06; C12P-021/08

File Segment: CPI; EngPI



1/5/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI  
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010429022

WPI Acc No: 95-330342/199543

XRAM Acc No: C95-146446

XRPX Acc No: N95-248643

Use of recombinant vector encoding specific protein to transform kidney cells - useful for gene therapy, induction of antibodies or protein prodn; also transgenic animals and their urine and transfected cells

Patent Assignee: INST NAT SANTE & RECH MEDICALE (INRM ); INST PASTEUR (INSP )

Inventor: FERRY N; MOULLIER P

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
FR 2717500	A1	19950922	FR 943151	A	19940317	C12P-021/02	199543 B

Priority Applications (No Type Date): FR 943151 A 19940317

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing	Notes	Application	Patent
FR 2717500	A1						

Abstract (Basic): FR 2717500 A

Use of a recombinant vector contg. 1 promoter, a nucleic acid sequence (I) encoding a desired protein (II) (including a signal sequence) and a 3'-polyadenylation sequence for transfecting kidney cells in an animal (partic. a mammal) is new. (II) is expressed in these cells and produced in the blood or urine of the animal.

Also new are:(a) a procedure for the prodn. of a heterologous protein in the urine of a mammal comprising:(i) manufacturing a compsn. contg. the vector as above;(ii) placing the compsn. in contact with kidney tubule cells via the renal artery, the ureter or the pyelocaliceal cavity;(iii) the recovery of the urine via a metabolic casing, and(iv) the opt. purification of (II);(b) medication contg. the vector as above, which can be administered to the renal cells of the host;(c) (II) or polypeptides produced in the blood or urine by the transfected cells;(d) non-human animals contg. renal tubule cells carrying the vector;(e) urine contg. (II) produced by these animals;(f) mammalian renal tubule cells contg. the vector, and(g) antibodies (Ab) (monoclonal or polyclonal) directed against an immunogen (IIa) secreted into the circulation by transformed renal cells.

USE - The vectors are partic. used in gene therapy, for immuno-modulation by altering the intravascular concn. of specific proteins, for inducing Ab prodn. or for prodn. of (II) (claimed). Typical (II) are e.g. factor VIII, erythropoietin, cytokines (eg IL-1), plasminogen activator, (I) may also be an antisense sequence that blocks the activity of a cytokine e.g. a transforming growth factor or a platelet derived growth factor (for treating glomerulosclerosis). The Ab are useful for diagnosis and therapy.

ADVANTAGE - Adenovirus vectors can transfect a variety of quiescent kidney cells and can be produced at a high titre. (II) is more easily



recovered from urine than from milk. The transfection procedure is easy to perform and treatment can be confined to just one kidney.

Dwg.0/1

Title Terms: RECOMBINATION; VECTOR; ENCODE; SPECIFIC; PROTEIN; TRANSFORM;

KIDNEY; CELL; USEFUL; GENE; THERAPEUTIC; INDUCTION; ANTIBODY; PROTEIN;

PRODUCE; TRANSGENIC; ANIMAL; URINE; TRANSFECTED; CELL

Derwent Class: B04; D16; P14

International Patent Class (Main): C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A01K-067/027; A61K-039/395; A61K-048/00; C12N-005/06; C12P-021/08

File Segment: CPI; EngPI



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/25193

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 A01K67/027 B09B3/00 A01K1/03 A01K31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 22249 A (AMERICAN NAT RED CROSS ; VIRGINIA TECH INTELL PROP; UNIV N CAROLINA) 24 August 1995 (1995-08-24) page 5, line 8 - line 15; claim 26 ---	1-15, 42
A	FR 2 717 500 A (INSTITUT PASTEUR ; INST NAT SANTE RECH MED) 22 September 1995 (1995-09-22) page 6 - page 7, paragraph 3 ---	1-15, 42-44
A	WO 96 39494 A (UNIV NEW YORK ; SUN TUNG TIEN (US)) 12 December 1996 (1996-12-12) examples 1,2 ---	1-15 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 July 1999

Date of mailing of the international search report

23.07.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/25193

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>Velander W. "Methods for the degradation and detoxification of organic material using urine produced by transgenic animals and related transgenic animals and proteins. 29 July 1997. Virginia Tech Intellectual Properties, Inc. Disclosure No.:98-011.</p> <p>Available from Internet via  <a href="http://www.vtip.org">http://www.vtip.org</a>  XP002099574  the whole document</p> <p>---</p>	1-24, 32-44
X	<p>EP 0 749 876 A (PEUGEOT ;CITROEN SA (FR))  27 December 1996 (1996-12-27)  column 7, line 7 - line 32; figure 1</p> <p>---</p>	25-29,31
X	<p>EP 0 051 876 A (THOREN CAGING SYSTEMS INC)  19 May 1982 (1982-05-19)  page 6</p> <p>---</p>	25-29,31
X	<p>WO 92 06590 A (US GOVERNMENT)  30 April 1992 (1992-04-30)  page 7; figure 1</p> <p>-----</p>	25,26, 28,30



(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 717 500

(21) N° d'enregistrement national : 94 03151

(51) Int Cl<sup>e</sup> : C 12 P 21/02, 21/08, A 61 K 48/00, 39/395, A 01 K  
67/027, C 12 N 5/06

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 17.03.94.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR Fondation  
privée reconnue d'utilité publique — FR et INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE Etablissement public — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 22.09.95 Bulletin 95/38.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(72) Inventeur(s) : Moullier Philippe et Ferry Nicolas.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Gutmann Ernest - Plasseraud Yves S.A.

(54) Procédé d'infection de cellules rénales par un vecteur recombinant.

(57) L'invention concerne l'utilisation d'un vecteur recombinant contenant dans sa structure au moins un promoteur et une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt de nature protéique munie d'une séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation, dans la fabrication d'une composition qui, lorsqu'elle est mise en contact avec des cellules rénales d'animaux, de préférence des mammifères, induit l'expression de ladite substance d'intérêt dans ces cellules et sa production dans le sang ou l'urine desdits animaux, de préférence les mammifères.

FR 2 717 500 - A1



**PROCEDE D'INFECTION DE CELLULES RENALES PAR UN VECTEUR  
RECOMBINANT**

La présente invention est relative à l'utilisation de vecteurs recombinants dans la fabrication d'une composition permettant l'expression dans des cellules rénales, et plus particulièrement tubulaires et glomérulaires, d'une protéine susceptible d'être sécrétée soit dans le flux sanguin, soit dans l'urine d'un mammifère.

La possibilité de transférer des gènes étrangers sous la dépendance de promoteurs dans des cellules de rein ouvre la possibilité à la fois d'envisager l'introduction de molécules biologiquement actives soit à des fins thérapeutiques, ou à des fins pharmacologiques, ou encore biotechnologiques, c'est-à-dire l'obtention d'une molécule hétérologue dans un fluide susceptible d'être extraite dudit liquide.

Dans les objectifs de transfert de gènes in vivo, l'utilisation de vecteurs viraux tels les rétrovirus recombinants ou les adénovirus a été principalement envisagée (référence 1).; certains vecteurs non viraux dans lesquels l'ADN est soit nu, soit complexé de façon électrostatique avec des substances inertes ont également été évoqués récemment (références 2 et 3).

Les rétrovirus recombinants sont les vecteurs les plus largement utilisés pour l'introduction de gènes dans une grande variété de cellules animales ; cependant, l'expression du gène étranger nécessite l'intégration de ce dernier dans le génome de la cellule.

hôte, laquelle intégration dépend de la division de la cellule au moment de l'infection virale.

Or, le rein est un organe dont le turn-over cellulaire est connu pour être lent (>200 jours) chez les mammifères. Ceci explique que les vecteurs rétroviraux qui ne peuvent infecter que des cellules en division, ne sont pas adaptés au transfert de gènes dans cet organe. Des résultats non publiés obtenus par les inventeurs montrent que quelle que soit la procédure utilisée - perfusion de l'artère rénale ou perfusion rétrograde de l'uretère au décours ou non d'un régénération tubulaire induite - l'efficacité de transduction est quasi nulle (référence 4).

Un travail publié récemment par une équipe japonaise utilisant des vecteurs non viraux (référence 5) fait état de la possibilité de transférer dans les glomérules rénaux de rat, des gènes codant pour le TGF $\beta$  et le PDGF. Cependant, l'utilisation de ces vecteurs dérivés des liposomes recouverts d'une hémagglutinine (HVJ-liposome) ne permet pas le transfert de gène dans les cellules tubulaires rénales ce qui exclut a priori la possibilité de faire sécréter des protéines recombinantes dans l'urine. L'expression des gènes est transitoire et ne persiste pas au-delà de 10 jours. Il est possible d'envisager qu'à partir de cette étude d'autres vecteurs non viraux ou mixtes (une partie chimique inerte complexée à un virus type adénovirus inactivé) puissent être utilisés avec succès dans le rein (référence 2).

Bosh et al. (référence 6) ont récemment montré qu'il était possible d'induire chez les rats adultes une réplication des cellules tubulaires aiguës après un traitement à l'acide folique par l'injection directe dans le parenchyme de rein, à cette étape, de rétrovirus

r combinants porteurs d'un gène "rep rter"  $\beta$ -galactosidase ; dans ces expériences, moins de 1% d'efficacité de transduction dans la zone d'injection a pu être observé.

Le rein est composé d'un cortex et d'une médullaire. Plus en aval, se trouve la cavité pyéocalicielle précédée des papilles. Le cortex et la médullaire sont composés de glomérules (unité de filtration du plasma) et de tubules qui sont situés dans le prolongement des glomérules. Les tubules permettent la maturation de l'ultrafiltrat issu du glomérule et forment donc l'urine définitive. Entre les tubules, existe un interstitium formé de cellules d'origine fibroblastique et de capillaires. Ces derniers sont formés par des cellules endothéliales. Il existe probablement dans l'interstitium des cellules, mal définies, présentatrices d'antigènes. Les glomérules sont des structures complexes composées de cellules endothéliales, épithéliales (podocytes) et mésangiales. Ces cellules peuvent participer au développement de pathologies rénales sévères qui aboutissent souvent à une glomérulosclérose définitive nécessitant des séances d'hémodialyse pluri-hebdomadaires. Les cellules épithéliales tubulaires peuvent être aussi le siège de dysfonctionnements qui peuvent évoluer vers une insuffisance rénale aiguë ou chronique.

La capacité de transférer un gène thérapeutique dans l'une ou l'autre de ces structures permet potentiellement de modifier le cours d'un processus pathologique rénal spécifique ; elle permet également d'envisager la production de molécules d'intérêt qui pourraient être excrétée par le processus naturel du rein dans l'urine.

Enfin, elle permet également par les capacités du rein et du fonctionnement notamment des cellules tubulaires le passage de molécules d'intérêt thérapeutique, par exemple en thérapie génique ou en immunomodulation, dans le système circulatoire par le biais de l'interstitium et des capillaires jouxtant lesdites cellules tubulaires.

Compte tenu des résultats médiocres et de la difficulté de mise en oeuvre du transfert de gène dans le rein par des rétrovirus recombinants, une approche alterne pourrait être l'utilisation d'adénovirus recombinants qui possèdent les avantages, notamment de pouvoir être obtenus à très haut titre, et de pouvoir transférer et exprimer le gène recombinant dans des cellules quiescentes. Cette approche présente en outre la possibilité d'atteindre un nombre élevé de types de cellules différentes, et enfin, les adénovirus peuvent interagir avec différentes membranes basales.

Les caractéristiques physiques et fonctionnelles du rein de mammifère telles que décrites plus haut présentent des avantages qui peuvent être résumés pour l'objet qui nous intéresse ici par les trois caractéristiques suivantes :

- facilité d'accès sans traumatisme aux tubules rénaux à la fois par la voie proximale (artère rénale) ou distale (uretère) d'une composition contenant une substance d'intérêt et notamment un vecteur recombinant,
- la capacité des cellules tubulaires à la fois de sécréter des substances dans l'urine ou dans le système circulatoire par la voie des capillaires,
- la facilité de récupération de l'urine d'animal et de séparation d'une protéine ou peptide qui pourrait être sécrétée dans ladite urine.

La possibilité de transférer *in vivo* un gène dans le rein ouvre trois nouvelles perspectives originales:

1. le transfert de gènes thérapeutiques dans une des structures rénales peut être destiné au traitement d'un dysfonctionnement de cet organe. Par exemple, l'expression d'antisens bloquant l'activité de certaines cytokines comme le TGF $\beta$  ou le PDGF devrait avoir une incidence favorable sur l'évolution des gloméruloscléroses. En effet, on sait depuis peu (références 5 et 9) que leurs surexpressions précipitent le déclin de la fonction glomérulaire.

2. le transfert de gènes thérapeutiques dans les cellules tubulaires rénales peut permettre d'obtenir, par le biais d'un ciblage vers le pôle basolatéral, une sécrétion dans la circulation du produit du gène. Par exemple, si le cDNA du facteur VIII est transféré dans de telles cellules, il devrait s'en suivre une sécrétion de facteur VIII disponible pour l'ensemble de l'organisme. Ici, le rein devient la source ectopique d'une protéine normalement synthétisée et sécrétée par le foie. Le fait que les mammifères soient pourvus de deux reins amène une certaine flexibilité à cette voie de transfert. D'autres protéines peuvent être concernées telles que la  $\beta$ -glucuronidase, ou une autre enzyme lysosomale comme l'alpha-iduronidase ou l'arylsulfatase B, un autre facteur de coagulation - le facteur IX -, l'érythropoïétine, des cytokines telles que l'IL2 et l'IL1 ou toute partie active de l'une de ces protéines ; à titre d'exemple, on pourra citer également les activateurs du plasminogène (streptokinase, urokinase), les inhibiteurs des activateurs du plasminogène.

3. A l'inverse après transfert dans des structures rénales, la protéine exogène peut ne pas être exportée dans la circulation mais au contraire transportée au pôle apical dans l'espace urinaire et excrétée dans l'urine sous forme active non dénaturée. Cette possibilité permet d'envisager qu'un animal de laboratoire comme le lapin soit destiné à la production de protéines recombinantes dès lors que ses urines sont collectées dans une cage métabolique. L'apport hydrique permet de régler les concentrations de protéines recombinantes dans l'urine finale puisque l'on peut faire varier à volonté l'osmolarité urinaire entre 50 et 1300 mOsm/L.

Il faut noter que l'urine d'un mammifère indemne d'affection rénale, est particulièrement pauvre en protéine endogène (0.3 à 0.6 mg/24hr par kg de poids corporel). Une électrophorèse des urines montre habituellement 30% d'albumine et 70% de globulines de faible poids moléculaire. Le pH normal oscille entre 4.6 et 7.8, et est compatible avec la plupart des protéines recombinantes que l'on souhaiterait obtenir sans dénaturation.

Ainsi la présence dans l'urine, d'une protéine recombinante produite en grande quantité par le tubule rénal, grâce à un promoteur fort, pose relativement peu de problème technique pour son extraction et purification. Ce procédé d'obtention apparaît donc plus simple, plus efficace et plus rapide que l'extraction de protéines recombinantes à partir des sécrétions lactées chez des animaux transgéniques où le cDNA exogène est mis sous le contrôle d'un promoteur activé pendant la lactation. A titre d'exemple, peuvent être sécrétées dans l'urine, des protéines telles que la  $\beta$ -glucuronidase, ou une autre enzyme lysosomale telle qu'

l'alpha iduronidase ou l'arylsulfatase B, un facteur d' coagulation t l que le facteur VIII u le facteur IX, l'érythropoïétine, des cytokines telles que l'IL2 et l'IL1 ou toute partie active de l'une de ces protéines ; on peut citer également les activateurs du plasminogène (streptokinase, urokinase) et inhibiteurs du plasminogène (PAI).

La présente invention consiste précisément à utiliser un vecteur recombinant contenant dans sa structure au moins un promoteur et une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt de nature protéique munie d'une séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation, dans la fabrication d'une composition qui, lorsqu'elle est mise en contact avec des cellules rénales de mammifères induit l'expression de ladite substance d'intérêt dans ces cellules et sa production dans le sang ou l'urine de mammifères.

Par vecteur recombinant, on entend ici tout vecteur de transfert de gènes non viral, viral ou rétroviral autorisant l'introduction d'une séquence d'acides nucléiques et son expression dans les cellules rénales.

Cette utilisation est particulièrement appropriée quand le vecteur est un vecteur viral et notamment un adénovirus et le promoteur un promoteur viral ; plus particulièrement encore, le titre du vecteur adénoviral est supérieur à  $10^9$  pfu/ml.

La composition contenant à titre de substance essentielle un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus fait également partie de l'invention.

L'utilisation du vecteur recombinant de l'invention est en outre caractérisée en ce que la composition qui le contient est mis en contact avec les

cellules tubulaires rénales proximales par perfusion par voie d'artère rénale ; l'administration par cette voie s'effectue comme décrit plus en détail ci-dessous dans les exemples.

Cette opération peut être réalisée chez tout mammifère possédant une ou plusieurs artères rénales permettant une perfusion homogène du parenchyme rénal. Le volume total de perfusion varie entre 1% et 10% du volume plasmatique de l'animal. Le débit de perfusion est inférieur de moitié voire plus, au débit physiologique. Le temps de clampage de l'artère rénale ne doit pas dépasser 15 min au risque d'induire des lésions rénales ischémiques graves. Si le transfert de gène concerne les deux reins simultanément, le clampage artériel sera aortique et réalisé juste en amont de l'artère rénale droite et immédiatement en aval de l'artère rénale gauche, quel que soit l'animal, l'injection se faisant par l'aorte entre les deux clamps.

L'utilisation en outre de la composition de l'invention contenant le vecteur recombinant peut être faite par mise en contact de ladite composition avec les cellules tubulaires distales par perfusion par la voie de l'uretère et de la cavité pyélo-calicielle ; le mode d'administration est également décrit plus bas dans les exemples.

Cette utilisation concerne tout mammifère possédant un uretère communiquant avec le rein par l'intermédiaire de la cavité pyélo-calicielle. Le volume total de perfusion représente 10% à 100% de la cavité pyélo-calicielle. La pression de perfusion exercée est variable selon le volume du perfusat utilisé. Le temps d'incubation se situe entre 5 et 30 min. On fera particulièrement attention à ne pas dévasculariser

l'uretre pendant les manœuvres de cathétérisation. Le recueil des urines est réalisé par l'intermédiaire d'une cage métabolique et une première étape de purification de la protéine ou du peptide d'intérêt pourrait être une précipitation à l'éthanol ou par le sulfate d'ammonium saturé. Ces précipitations seront adaptées en fonction des propriétés biochimiques et biophysiques de la protéine recombinante excrétée dans les urines. Au besoin, une alcalinisation des urines de l'animal sera réalisée par un apport hydrique enrichi en bicarbonate.

Tout mode d'extraction-purification de peptides, protéines simples ou complexes connu de l'homme du métier, telles que précipitation, filtration, électrophorèse, chromatographie, peut être avantageusement mis en œuvre selon la nature biochimique de la molécule et le degré de pureté recherché.

L'utilisation selon l'invention s'applique également lorsque la composition contenant le vecteur recombinant est un médicament destiné à la thérapie génique ou à l'immunomodulation, notamment par modification de la concentration intravasculaire de la substance d'intérêt produite par les cellules tubulaires rénales et excrétées dans le système circulatoire.

L'invention est également un procédé de production d'une protéine dans l'urine d'animaux, de préférence de mammifères, soit transgéniques, c'est-à-dire préalablement porteurs d'un gène étranger, soit normaux, et de mammifères caractérisé par la mise en œuvre des étapes suivantes :

a) la fabrication d'une composition contenant un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et sa séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence d'

polyad'nylation et sous la dépendance d'un pr moteur approprié à l'expression d ladite séquence dans les cellules tubulaires rénales de mammifères ;  
 b) l'injection de ladite composition dans le tube rénal par perfusion soit par voie de l'artère rénale, soit par voie de l'uretère et de la cavité pyélo-calicielle ;  
 c) le recueil des urines notamment par l'intermédiair d'une cage métabolique ;  
 d) le cas échéant, la purification de ladite molécule.

La protéine peut être homologue ou hétérologue à l'hôte.

Les vecteurs recombinants de l'invention intervenant dans le procédé et utilisés dans la fabrication d'une composition pour induire l'expression de ladite substance d'intérêt sont préférentiellement un vecteur viral capable de s'exprimer dans des cellules quiescentes, ledit vecteur pouvant être notamment un adénovirus ou un virus associé à l'adénovirus (AAV), et le promoteur utilisé est un promoteur eucaryote (notamment le promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase-PGK-murin) ou viral, notamment issu du SV40, du CMV, du HSV, de l'adénovirus, de l'AAV, du virus de la vaccine, du poliovirus ou un LTR de rétrovirus, notamment du RSV ou du HIV, de Moloney.

Le procédé de production d'une protéine dans l'urine de mammifère peut être mis en oeuvre par la mise en contact de la composition contenant le vecteur recombinant, avec les cellules tubulaires rénales par perfusion de préférence par voie de l'uretère, le volume total de perfusion représentant 10 à 100% de la cavité pyélo-calicielle.

L'invention est relative également à un médicament contenant un vecteur recombinant contenant dans sa séquence une séquence d'acides nucléiques codant

pour un substance d'intérêt thérapeutique muni d'une séquence signal et d'une séquence de polyadénylation pour modifier la concentration intravasculaire de ladite substance d'intérêt, caractérisé en ce que ledit médicament est administré par perfusion dans les cellules rénales soit par voie de l'artère rénale, soit par l'uretère.

Le médicament selon l'invention est caractérisé en ce que la substance d'intérêt est notamment une protéine déficiente dans la circulation sanguine ou une cytokine pour immunomodulation. Par exemple, si le cDNA du facteur VIII est transféré dans de telles cellules, il devrait s'ensuivre une sécrétion de facteur VIII disponible pour l'ensemble de l'organisme.

Un tel médicament contenant un vecteur recombinant porteur d'une séquence d'acides nucléiques est susceptible d'être utilisé pour induire la synthèse de toute substance d'intérêt thérapeutique par ces cellules tubulaires rénales ; à titre d'exemple, on peut citer des substances dont la fonction est de compenser un déficit, ou encore de modifier un équilibre, notamment immunologique, par exemple avec des cytokines.

Un médicament ou une composition selon l'invention peut également être utilisé dans un procédé pour induire la synthèse et l'excrétion dans le système circulatoire d'un antigène ; un tel antigène est alors susceptible d'induire, quand il est hétérologue à l'hôte, la stimulation du système immunitaire et la production :

- soit d'anticorps polyclonaux dans le sérum,
- soit d'anticorps sécrétés par des hybridomes obtenus par fusion de cellules de rate du mammifère traité avec un myélome.

L'invention est aussi relative à un procédé d'induction d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisé par :

- l'introduction dans des cellules rénales d'un mammifère d'un vecteur recombinant porteur d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un immunogène,
- la sécrétion dudit immunogène dans le système circulatoire.

Le médicament ou la composition selon l'invention dont on souhaite qu'il induise une production de molécules hétérologues dans la circulation sanguine est administré de préférence par perfusion de l'artère rénale dans les conditions expérimentales évoquées plus haut et décrites en détail dans l'exemple II, le volume de perfusion variant entre 1 et 10% du volume plasmatique de l'animal ou de l'homme.

Font également partie de l'invention :

- les protéines ou les polypeptides produits dans le sang ou dans l'urine par les cellules rénales d'un animal préalablement infectées par la composition de l'invention contenant le vecteur recombinant ;
- les anticorps éventuellement induits dans la circulation sanguine ou dans la rate grâce à la synthèse d'une protéine hétérologue par les cellules rénales et sa sécrétion dans la circulation sanguine ;
- ces compositions thérapeutiques contenant à titre de principe actif les anticorps obtenus par le procédé de l'invention ;
- l'utilisation de ces anticorps dans un test de diagnostic ;
- un kit de diagnostic contenant les anticorps obtenus par le procédé de l'invention.

L'invention est également relative à une composition contenant un vecteur recombinant contenant

dans sa séquenc une séquenc d'acides nucléiques c dant pour un substance d'intérêt thérap utique muni d'une séquence signal et d'une séquence de polyadénylation pour utilisation dans un procédé de production d'une protéine hétérologue dans l'urine d'un animal ; cette composition est caractérisée en ce que le vecteur est un vecteur viral capable de s'exprimer dans des cellules quiescentes, ledit vecteur pouvant être notamment un adénovirus, et en ce que le promoteur est un promoteur viral, notamment voisin du SV40, du CMV, du HSV, de l'adénovirus, de l'AAV, du virus de la vaccine, du poliovirus ou un LTR de rétrovirus, notamment du RSV ou du HIV ou de Moloney (MoLV).

La composition peut être administrée à l'homme ou à l'animal par infusion dans les cellules rénales par voie de l'artère rénale ou de préférence par voie de l'uretère, le volume total de perfusion représentant 10 à 100% de la cavité pyélo-calicielle.

Les mammifères non humains dont les cellules tubulaires rénales contiennent un vecteur recombinant contenant dans sa séquence une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt thérapeutique munie d'une séquence signal et d'une séquence de polyadénylation, et notamment ceux dont ladite substance peut être purifiée à partir de l'urine dudit mammifère font également partie de l'invention.

L'urine de mammifère contenant une protéine recombinante obtenue :

a) par la mise en contact des cellules tubulaires rénales avec une composition contenant un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et sa séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation et sus la dépendance d'un promoteur

approprié à l'expression de ladite séquence dans les cellules tubulaires rénales de mammifères ;

b) ladite mise en contact étant réalisée par perfusion par voie de l'uretère ;

c) le recueil de l'urine notamment par l'intermédiaire d'une cage métabolique fait partie de l'invention.

Enfin, les cellules tubulaires rénales de mammifères caractérisées en ce qu'elles contiennent un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et sa séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation et sous la dépendance d'un promoteur approprié à l'expression de ladite séquence dans lesdites cellules susceptibles de produire un peptide ou une protéine homologue ou hétérologue à l'hôte font partie de l'invention.

Les adénovirus recombinants qui ont été préférentiellement utilisés sont dérivés de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5).

Ce virus recombinant permet le transfert dans différents compartiments du rein et l'efficacité de transduction dans les cellules quiescentes varie de 20 à 60% des cellules rénales, qu'elles soient d'origine tubulaire ou glomérulaire.

La durée d'expression est transitoire (approximativement 1 mois) avec ce type d'adénovirus recombinant.

Les adénovirus recombinants utilisés ont été décrits dans L. Stratford-Perricaudet et al. (référence 7) ou par W. McGrory et al. (référence 8) ; le plasmide de base est un dérivé de pML2 (Perricaudet) ou pXCX2 (Graham) qui contient plusieurs séquences de l'adénovirus type 5 (Ad5) permettant la construction d'un génome adénoviral recombinant transportant un gène

exogène contrôlé par un variété de promoteurs potentiels - Major Late Promoter (MPL), Long Terminal Repeat (LTR) de RSV, Phospho Glycérate Kinase (PGK), etc.... Flanqués d'un site EcoRI et d'un polylinker on trouve successivement : 455 pb de l'extrémité 5' de l'Ad5 fournissant les Inverted Terminal Repeat (ITR) et la séquence d'encapsidation avec les "augmenteurs" (enhancers) E1A; le promoteur suivi ou non des séquences leader tripartites; un site ou non polylinker; le gène exogène (marqueur ou thérapeutique) que l'on souhaite transférer; une séquence de l'Ad5 (mu 9.4 - 17 ou 3328pb - 5788pb) grâce à laquelle le plasmide peut recombiner avec le génome de l'Ad5 pour fournir le virus recombinant. Le cDNA étranger inséré contiendra un signal de polyadénylation. La région E3 (27742pb - 29933pb) peut éventuellement être déletée pour augmenter l'espace disponible à l'insertion du transgène. Son rôle est mal connu mais elle semble impliquée dans la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus. La propagation virale s'effectue dans des cellules L293 (référence 7) qui ont la particularité de complémenter en trans la fonction E1. La cotransfection de ce plasmide avec un plasmide adénoviral déleté, décrits ci-dessus, dans des L293 peut être suivie d'événements de recombinaison homologue et permettre la génération d'adénovirus recombinants défectifs pour la réplication.

Un adénovirus recombinant véhiculant le cDNA de la  $\beta$ -glucuronidase humaine sous le contrôle du promoteur PGK a été obtenu. Précisément, il s'agit du promoteur murin codant pour la phosphoglycérate kinase (position -524 à -20, avant le codon de début de traduction, d'après Adra et al., Gene 60, 65-74, 1987.

Une autre application ou utilisation des compositions de l'invention concerne les applications in

vitro. Ces compositions contenant un vecteur recombinant, de préférence viral, contenant dans sa structure au moins un promoteur et une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt de nature protéique munie d'une séquence signal et flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation, peut être utilisée pour infecter efficacement, jusqu'à 100% :

- a) des cellules tubulaires rénales proximales ou distales issues de reins d'animal, par exemple de lapins, à partir de tubules isolés, micro-disséqués;
- b) des cellules rénales, mésangiales ou épithéliales, glomérulaires, en culture mono-couche issues d'une variété d'espèce (souris, rats, lapins, hommes, etc...).

En (a), les tubules sont micro perfusés avec une solution d'adénovirus recombinant pendant 10 à 20 min à un titre viral variant de  $10^8$  à  $10^{11}$  pfu/ml. L'activité du transgène est étudiée après une période variable (24 à 48hrs).

En (b), l'infection est effectuée sur des cellules confluantes ou maintenues en division lente. L'infection consiste à ajouter au milieu de culture habituel, l'adénovirus recombinant à une concentration variant de  $10^8$  à  $10^{11}$  pfu/ml. Le milieu est changé après quelques heures et l'activité du transgène détectée dans les 24 à 48hrs.

De plus, la procédure en (b) autorise, une fois l'infection réalisée in vitro, de réinjecter les cellules rénales génétiquement modifiées dans l'artère rénale pour leur réimplantation et survie à long terme. Les cellules mésangiales murines peuvent en effet être réimplantées spécifiquement dans le mésangium du glomérule et survivre en exprimant le transgène pendant plusieurs semaines. Cette procédure permet de développer

des protocoles de thérapie génique ex vivo sur des modèles animaux.

Ces modèles in vitro peuvent également être utilisés en pharmacologie.

Les exemples ci-dessous, sans aucun caractère limitatif, montrent le caractère bien fondé de cette approche expérimentale à la fois et principalement en thérapie génique et pour l'obtention de substances d'intérêt dans ce liquide biologique qu'est l'urine.

La figure 1 représente en coloration histochimique des reins de rat préalablement infectés par l'adénovirus recombinant porteur du gène LacZ. Les photographies montrent la distribution des cellules tubulaires de papilles du rat n° 9 du tableau modifiées génétiquement. La figure 1a représente un grossissement de 25 fois et la figure 1b un grossissement de 250 fois.

La transfert de gène est suivi sur des sections de cryostat comme décrit dans la référence 13. Les reins gauche et droit ont été fixés *in situ* en perfusant de la paraformaldéhyde à 4% dans une solution de PBS. Les reins sont ensuite coupés dans des blocs d'épaisseur 5 mm ; les blocs sont ensuite incubés pendant la nuit à 30°C avec du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal; Sigma) à pH 8.5, ou immersés pendant la nuit avec 30% de sucre à 4°C, congelés dans l'isopentane et utilisés pour préparer des sections de cryostat de 10 µm d'épaisseur. Les sections de tissu sont ensuite incubées avec le substrat X-gal et ensuite contre-colorées avec l'hématoxyline.

Cette figure montre clairement l'efficacité de la transfection et de l'expression du gène étranger dans les cellules de rein.

- Stratégie expérimentale utilisée :

Un adénovirus recombinant qui transduit sous le contrôle d'un promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV), le gène LacZ (NlsLacZ) codant pour la  $\beta$ -galactosidase d'Escherichia coli a été utilisé comme vecteur et appelé Ad- $\beta$ gal.

Le gène LacZ a été fusionné avec une séquence d 21 acides aminés issus de la séquence codant pour l'antigène grand T de SV40 qui induit une localisation exclusivement nucléaire de la protéine (référence 9).

Pour valider si cette construction est capable de diriger l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans le rein, la préparation virale a été sélectivement perfusé dans l'artère rénale gauche ou dans l'uretère de rats Wistar âgés de 8 à 10 semaines (Iffa credo, l'Arbresle, France).

Les animaux ont été sacrifiés à différents intervalles de temps entre 7 et 30 jours après la perfusion artérielle ou l'infusion uretérale et les cellules génétiquement modifiées ont été testées en histochimie quant à la présence de  $\beta$ -galactosidase dans le noyau.

Les reins droits qui ont été exclus de la perfusion par Ad- $\beta$ gal ont été utilisés comme des contrôles internes.

En outre, le foie, le poumon et la vessie ont été testés quant à une contamination "possible" du vecteur recombinant à des  $\beta$ -gal hors du rein perfusé.

Les échantillons d'urine obtenus à partir d'un rein expérimental ont été collectés avant l'infusion artérielle ou à différents intervalles de temps après l'infusion uretérale de la composition afin d'évaluer la présence d'adénovirus recombinants.

Dans tout ce qui suit, on parlera indifféremment d'infusion uretérale, par voie d'uretère, ou rétrograde, pour toute administration de la composition contenant le vecteur recombinant par cathéter dans la voie de l'uretère.

- EXEMPLE I : Préparation de l'adénovirus recombinant:

Un adénovirus défectif pour sa réplication dérivé du sérotype Ad5 a été utilisé ; la structure de l'adénovirus Ad- $\beta$ gal a été décrite dans L. Stratford-Perricaudet (référence 7).

Dans ce virus, les séquences E1 de 1,3 à 9,4 mu ont été déletées et remplacées avec un minigène contenant le promoteur LTR du RSV ; le gène LacZ comprenant une séquence de localisation nucléaire et la région du SV40 codant pour le signal de polyadénylation ; en outre, les séquences E3 s'étendant de 78,5 à 84,7 mu ont été déletées.

Des stocks de virus recombinants ont été préparés de la façon suivante :

Des cultures de cellules L293 (plaques NUNC 4x600 cm<sup>2</sup>, Roskilde, Danemark) sont cultivées en milieu DMEM contenant 10% de sérum foetal de veau, 100 unités/ml de pénicilline, et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine, ont été infectées à 80% de confluence à une multiplicité d'infections (MOI) de 5 pfu par cellule.

Trente heures après l'infection, les cellules sont collectées et resuspendues dans 10 ml de milieu de culture, puis soumises à 4 cycles de congélation/décongélation suivis par une séparation de débris cellulaires par une centrifugation à 4500 rpm pendant 5 minutes.

Les surnageants viraux sont ensuite déposés sur un gradient de chlorure de césium et centrifugés pendant 1 heure à 35000 rpm.

Les particules virales intactes sont ensuite soumises à une seconde centrifugation en chlorure de césium pendant 18 h à 35000 tours/mn.

Les particules virales sont ensuite collectées, puis dialysées contre du tampon PBS contenant 10% de glycérol.

Les stocks de virus sont ensuite titrés par infection des cellules L293 avec des dilutions en série de la préparation virale pendant 1 h à 37°C.

Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont fixées en PBS contenant 1% de formaldéhyde et 0,5% de glutaraldéhyde et colorées avec X-gal pendant 18 h à 30°C.

Le nombre de clones bleus est évalué pour déterminer le titre viral.

Les stocks de virus ont été congelés à -80°C dans 10% de glycérol jusqu'à utilisation.

Immédiatement avant leur utilisation, les stocks de virus sont dilués dans du PBS à la concentration de 1 à  $5 \cdot 10^{10}$  pfu/ml.

Aucun des virus du stock utilisé dans ces expériences ne contient de virus compétent pour la réplication, comme cela a pu être évalué sur des cellules HeLa après une culture extensive par la méthode décrite dans (10).

#### - EXEMPLE II : Perfusion de l'artère rénale :

Le flux sanguin du rein gauche de 7 rats adultes a été interrompu pour moins de 10 minutes par clampage de l'aorte sous l'artère mésentérique supérieure et au-dessus de l'artère mésentérique inférieure.

Ce dispositif exclut sélectivement le rein gauche sans affecter le flot sanguin dans le rein droit correspondant.

Selon son implantation, l'artère adrénale gauche a été éventuellement ligaturée pendant cette opération.

En utilisant une aiguille de calibre 30,  $1.10^{10}$  pfu/ml du vecteur recombinant Ad- $\beta$ gal, suspendus dans du PBS dans un volume final de 2 ml ont été directement injectés dans l'aorte au voisinage de l'artère rénale gauche avec un flux de 1 à 2 ml par minute.

Après l'administration du vecteur recombinant Ad- $\beta$ gal, le flot sanguin rénal a été rétabli et le rein a été vérifié quant à sa reperfusion homogène.

Après cette opération, aucun changement macroscopique n'a été trouvé au moment du sacrifice des animaux (à 7, 15 et 30 jours).

Les reins apparaissent perfusés de façon homogène et aucune différence n'est visible entre le rein perfusé et le rein contrôle.

L'activité  $\beta$ -galactosidase peut être détectée dans les reins jusqu'à 15 jours après la perfusion et exclusivement au niveau du cortex au niveau des tubes rénaux.

Le tableau 1 ci-dessous montre une estimation des cellules positives, c'est-à-dire exprimant le gène  $\beta$  gal dans la région du cortex. Seules quelques cellules isolées ont été mises en évidence 30 jours après perfusion.

Tableau 1  
Expression de  $\beta$ -galactosidas nucléaire  
dans le rein gauche transduit

Perfusion rénale artérielle	Jour du sacrifice	Expression de la $\beta$ - galactosidase nucléaire *	
		Cortex	Médulaire/ Papillaire
Rat	N°1	++	0
	N°2	+++	0
	N°3	+++	0
	N°4	++	0
	N°5	++	0
	N°6	+	0
	N°7	0	0
Infusion rétrograde par l'uretère			
Rat	N°8	0	+
	N°9	0	+++
	N°10	0	++
	N°11	+	++
	N°12	0	+
	N°13	0	0
	N°14	0	0

Les symboles sont :

0 = aucun; + = bas; ++ = intermédiaire; +++ = élevé.

\* Niveau approximatif des cellules tubulaires transduites.

Les cellules positives pour la  $\beta$ gal apparaissent exclusivement localisées dans le cortex et aucun transfert de gène n'a eu lieu dans les structures glomérulaires, corticales et médullaires, ni dans les compartiments vasculaires ou intersticiels.

Le rein contrôle ne contient jamais de  $\beta$ -galactosidase.

Dans la mesure où le vecteur Ad- $\beta$ gal peut infecter un nombre de types cellulaires différents et le système utilisé ici n'empêche pas l'infection des autres tissus, nous avons évalué que d'autres organes plus distants auraient pu être transduits également par ces vecteurs recombinants.

Le foie et les poumons des animaux 3 et 4 ont été examinés et aucune détection de coloration bleu correspondante n'a pu être détectée, suggérant que le premier passage à travers le rein via l'artère rénale résulte essentiellement par l'infection des cellules tubulaires proximales par ledit virus recombinant.

- EXEMPLE III : Infusion rétrograde :

Un tube PE10 a été inséré dans l'uretère gauche de 7 rats adultes et glissé dans la cavité pyélo-calicielle dans laquelle 300  $\mu$ l d'une solution d'Ad- $\beta$ gal recombinante à  $5.10^{10}$  pfu/ml ont été injectés et incubés pendant 5 minutes. La pression pendant la procédure d'injection est telle qu'il n'y a aucune déformation de la cavité pyélo-calicielle ; le cathéter est ensuite enlevé et le flot urinaire rétabli.

Le rein droit correspondant a été sélectivement injecté avec la solution tampon dépourvue de virus recombinant et utilisé ensuite comme un contrôle interne relativement à la coloration Xgal.

Dans la mesure où la cathétérisation rétrograde de l'uretère est un procédé clinique tout à fait classique, le succès d'un transfert de gène étranger *in situ* dans le rein par cette méthode simple et hautement spécifique est particulièrement intéressant.

Les 7 rats qui ont été traités de cette façon et ensuite examinés à différents intervalles de temps après l'injection (7, 10 et 15 jours), aucun de ces 7 rats ne présente d'aspect macroscopique ou histologique modifié soit sur le plan hémodynamique, soit présentant des manifestations toxiques, liées à l'utilisation de ce type de procédé.

Les structures rénales restent inchangées même immédiatement après l'injection rétrograde et aucune différence n'a pu être observée avec le rein contrôle.

L'activité  $\beta$ -galactosidase au niveau du noyau, peut être aisément détectée sur les reins 7 jours après l'injection du vecteur Ad- $\beta$ gal. Le tableau 1 ci-dessus montre une estimation des cellules positives dans les régions papillaires/médulaires mesurée sur des sections des reins ; une fraction importante des cellules transduites a été trouvée dans le rat n° sacrifié 7 jours après l'injection ; les rats 10 et 11 montrent un niveau intermédiaire de cellules modifiées génétiquement; enfin, seulement quelques cellules ont été trouvées être transduites dans les rats 8 et 12 sacrifiés à 7 et 15 jours respectivement.

En dépit de cette hétérogénéité dans l'efficacité du transfert de gène *in vivo* dans ce groupe, l'analyse individuelle révèle que les cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase apparaissent essentiellement limitées aux cellules médulaires et papillaires impliquant les cellules tubulaires à l'exclusion d'un transfert de gène dans les structures glomérulaires, ainsi que dans les compartiments interstitiels.

Après le transfert de gène, l'urine a été évaluée pour la présence du vecteur Ad- $\beta$ gal en utilisant le système des cellules L293 décrit plus haut.

Dans le rat 11, qui indique un bon transfert médulaire et papillaire, avec aucune cellules positive en  $\beta$ -galactosidase sur des sections de vessie, la concentration de virus dans l'urine diminue de façon très importante pendant les 2 premiers jours suivant l'injection rétrograde (3750 pfu/ml/h par mg de créatinine uré le premier jour contre 240 pfu/ml/h par

mg-1 de créatinine urée au jour 2) et stabilisés ensuite à un niveau à peine détectable (inférieur à 10 pfu/ml).

- CONCLUSION :

Ces expériences montrent que le vecteur recombinant adénovirus peut, de façon efficace, transduire des cellules de rein par perfusion de l'artère rénale ou injection rétrograde via l'uretère sans aucun dommage du tissu, et avec une efficacité de transduction importante (> 20-30%).

D'autres stratégies expérimentales sont envisageables en utilisant des titres viraux plus élevés, des volumes de solution de la composition contenant l'adénovirus plus grands où des temps de contact plus élevés pourront très certainement augmenter de façon significative l'efficacité du transfert de gène.

Par exemple, l'utilisation de titres viraux plus élevés (jusqu'à  $10^{12}$  pfu/ml) peut être tout à fait intéressante compte tenu de l'absence d'effet secondaire pour les raisons suivantes :

- a) des études récentes ont montré que l'efficacité du transfert de gène in vitro comme in vivo dans le foie, le poumon ou les cellules musculaires, est directement reliée au titre du vecteur viral recombinant dans une fourchette de  $10^7$  à  $10^{12}$  pfu/ml;
- b) la membrane basale tubulaire peut agir d'une part comme une barrière anatomique nécessitant de hautes concentrations de vecteur adénoviral et, d'autre part, comme une protection relative contre des effets cytopathiques induits par l'adénovirus tels que décrits dans le foie pour des titres au-delà de  $7.10^{10}$  pfu/ml (référence 11) ou  $1.10^9$  pfu/ml dans le cerveau (référence 12)

Les avantages de ce système sont très importants à plusieurs titres :

- 1) seulement un des deux reins peut être modifié génétiquement et de façon sélective ;
- 2) selon le mode d'administration - perfusion par l'artère rénale ou injection rétrograde par l'uretère - il est possible de choisir le compartiment préférentiel dans lequel la molécule hétérologue sera sécrétée : la circulation sanguine ou l'urine respectivement ;
- 3) ce mode d'administration confère à l'animal ou à l'homme un minimum d'inconvénient : la perfusion par la voie de l'artère rénale est une opération tout à fait classique et sans risque réalisé par les urologues ; quant à l'injection par la voie rétrograde, elle est bénigne ;
- 4) le vecteur adénovirus peut être un outil expérimental pour changer ou ajouter l'expression d'un gène dans le rein par une voie simple et non invasive et sur une large gamme d'animaux de laboratoire ;
- 5) lorsque l'expression du produit transgénique se fait par le côté basolatéral des cellules tubulaires vers les capillaires, le rein peut représenter une source ectopique d'un peptide ou d'une protéine thérapeutique directement utilisable dans la circulation sanguine ;
- 6) enfin, lorsque la sécrétion du produit transgénique a lieu dans le tube rénal, et excrété dans l'urine cela fournit directement une source de liquide biologique contenant le peptide ou la protéine d'intérêt dans un milieu par essence très pauvre en protéines, ce qui conduit à une purification relativement aisément de ladite protéine.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Mulligan RC: The basic Science of Gene Therapy. *Science* 260:926-932, 1993.
2. Gao L, Wagner E, Cotten M, Agarwal S, Harris C, Romer M, Miller L, Hu PC, Curiel D: Direct in vivo Gene Transfer to Airway Epithelium Employing Adenovirus-Polylysine-DNA Complexes. *Hum. Gene Ther.* 4:17-24, 1993.
3. Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kirlappos M, Mechtler K, Curiel DT, Birnstiel ML: Coupling of Adenovirus to Transferrin-Polylysine/DNA Complexes Greatly Enhances Receptor-Mediated Gene Delivery and Expression of Transfected Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103, 1992.
4. Miller DG, Adam MA, Miller AD: Gene Transfer by Retrovirus Vectors Occurs only in Cells that are Actively Replicating at the Time of Infection. *Mol. Cell Biol.* 10:4239-4242, 1990.
5. Y.Isaka, Y.Fujiwara, N.Ueda, Y.Kaneda, T.Kamada, E.Imai. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- $\beta$  or platelet-derived growth factor gene into rat kidney *J.Clin.Invest.* 1993, 92:2597-2601.
6. Bosch R, Woolf AS, Fine LG: Gene Transfer into Mammalian Kidney: Direct Retrovirus-Transduction of Regenerating Tubular Epithelial Cells. *Exp. Nephrol.* 1:49-54, 1993.
7. L.Stratford-Perricaudet, M.Levrero, JF.Chasse, M.Perricaudet, P.Briand. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum.Gene Ther.* 1990, 1:241-256.
8. W.McGrory, D.Bautista, F.Graham. A simple technique for the rescue of early region I mutations

into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 1988, 163:614-617.

9. Gene transfer into the glomerulus via a mesangial cell vector: Site-directed gene delivery, in situ amplification and sustained expression of a gene product. Abstract 123P de l'American Society of Nephrology, 1993.

10. R.Bosch, A.Woolf, L.Fine. Gene transfer into the mammalian kidney: Direct retrovirus-transduction of regenerating tubular epithelial cells. *Exp Nephrol* 1993, 1:49-54.

11. Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet L, Woo SLC: Assessment of Recombinant Adenoviral Vectors for Hepatic Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 4:403-409, 1993.

12. Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet L, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A, Peschanski MR: Transfer of a Foreign Gene into the Brain using Adenovirus Vector. *Nature Genet.* 3:224-228, 1993.

13. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard JM: Retroviral-mediated Gene Transfer into Hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381, 1991.

**REVENDICATIONS**

1. Utilisation d'un vecteur recombinant contenant dans sa structure au moins un promoteur et une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt de nature protéique munie d'une séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation, dans la fabrication d'une composition qui, lorsqu'elle est mise en contact avec des cellules rénales d'animaux, de préférence des mammifères, induit l'expression de ladite substance d'intérêt dans ces cellules et sa production dans le sang ou l'urine desdits animaux, de préférence les mammifères.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le vecteur utilisé est un vecteur viral, notamment un adénovirus, et que le promoteur est un promoteur viral ou eucaryote.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est mise en contact avec des cellules rénales par perfusion par voie de l'artère rénale.

4. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est mise en contact avec des cellules tubulaires distales par perfusion par la voie de l'uretère et de la cavité pyélo-calicielle.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la composition est un médicament destiné à la thérapie génique ou l'immunomodulation par modification de la concentration intravasculaire de ladite substance d'intérêt.

6. Procédé de production d'une protéine hétérologue dans l'urine de mammifères, caractérisé par la mise en oeuvre des étapes suivantes :

- a) la fabrication d'une composition contenant un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et sa séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence d'polyadénylation et sous la dépendance d'un promoteur approprié à l'expression de ladite séquence dans les cellules rénales de mammifères ;
- b) la mise en contact de ladite composition avec les cellules tubulaires rénales par voie de l'artère rénal ou par voie de l'uretère et de la cavité pyélo-calicielle ;
- c) le recueil des urines notamment par l'intermédiaire d'une cage métabolique ;
- d) le cas échéant, la purification de ladite molécule.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur viral capable de s'exprimer dans des cellules quiescentes, ledit vecteur pouvant être notamment un adénovirus, et en ce que le promoteur est un promoteur eucaryote ou viral, notamment issu du SV40, du CMV, du HSV, de l'adénovirus, de l'AAV, du virus de la vaccine, du poliovirus ou un LTR de rétrovirus, notamment de RSV, de HIV ou de MoLV.

8. Procédé selon les revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que la mise en contact de la composition avec les cellules tubulaires rénales est réalisée par infusion par voie de l'uretère, le volume de la composition représentant 10% à 100% de la cavité pyélo-calicielle.

9. Médicament contenant un vecteur recombinant contenant dans sa séquence une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt thérapeutique munie d'une séquence signal et d'une séquence de polyadénylation pour modifier la concentration intravasculaire de ladite substance

d'intérêt, caractérisé en ce que ledit médicament est administré dans les cellules rénales de l'hôte.

10. Médicament selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est administré dans les cellules rénales de l'hôte par perfusion dans les tubes rénaux soit par voie de l'artère rénale, soit par l'uretère.

11. Médicament selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que la substance d'intérêt est notamment une protéine déficiente pour thérapie génique, ou une cytokine pour immunomodulation.

12. Médicament selon les revendications 9 à 11, caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur viral capable de s'exprimer dans des cellules présentes, ledit vecteur pouvant être notamment un adénovirus, et en ce que le promoteur est un promoteur viral, notamment voisin du SV40, du CMV, du HSV, de l'adénovirus, de l'AAV, du virus de la vaccine, du poliovirus ou un LTR de rétrovirus, notamment de RSV, de HIV ou de MoLV.

13. Médicament selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisé en ce qu'il est administré de préférence par perfusion dans les cellules rénales par voie de l'artère rénale, le volume de perfusion variant entre 1% et 10% du volume plasmatique de l'animal ou de l'homme.

14. Composition contenant un vecteur recombinant contenant dans sa séquence une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt thérapeutique munie d'une séquence signal et d'une séquence de polyadénylation pour utilisation dans un procédé de production d'une protéine hétérologue dans l'urine d'un animal hôte.

15. Protéines ou polypeptides produits dans le sang ou l'urine par des cellules rénales d'un animal

préalablement infectées par un vecteur recombinant ou une composition le contenant.

16. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que le vecteur est un vecteur viral capable de s'exprimer dans des cellules quiescentes, ledit vecteur pouvant être notamment un adénovirus, et en ce que le promoteur est un promoteur eucaryote ou viral, notamment voisin du SV40, du CMV, du HSV, de l'adénovirus, de l'AAV, du virus de la vaccine, du poliovirus ou un LTR de rétrovirus, notamment de RSV, de HIV ou de Molv.

17. Composition selon les revendications 14 ou 16, caractérisée en ce qu'elle est administrée de préférence dans les tubes rénaux par voie de l'uretère, le volume total de perfusion représentant 10% à 100% de la cavité pyélo-calicielle.

18. Animal non humain caractérisé en ce que ses cellules tubulaires rénales contiennent un vecteur recombinant contenant dans sa séquence une séquence d'acides nucléiques codant pour une substance d'intérêt munie d'une séquence signal et d'une séquence de polyadénylation.

19. Mammifère selon la revendication 18, caractérisé en ce que ladite substance peut être purifiée à partir de l'urine dudit mammifère.

20. Urine d'animal, notamment de mammifère, contenant une protéine recombinante, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par la mise en contact des cellules tubulaires rénales avec une composition contenant un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et sa séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation et sous la dépendance d'un promoteur

approprié à l'expression de ladite séquence dans les cellules tubulaires rénales de mammifères.

21. Urine selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite mise en contact est réalisée par perfusion par voie de l'uretère et en ce que l'urine est recueillie notamment par l'intermédiaire d'une cage métabolique.

22. Cellules tubulaires rénales de mammifères caractérisées en ce qu'elles contiennent un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et sa séquence signal, flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation et sous la dépendance d'un promoteur approprié à l'expression de ladite séquence dans lesdites cellules susceptibles de produire un peptide ou une protéine hétérologue.

23. Utilisation d'une composition contenant un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour un immunogène muni d'une séquence signal flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation et sous la dépendance d'un promoteur approprié à l'expression de ladite séquence dans les cellules rénales dans la fabrication d'une composition apte à induire la synthèse d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux chez un mammifère.

24. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre un immunogène sécrété dans le système circulatoire d'un mammifère par les cellules rénales dudit mammifère préalablement infectées par un vecteur recombinant contenant dans sa structure une séquence d'acides nucléiques codant pour un immunogène muni d'une séquence signal flanquée en 3' d'une séquence de polyadénylation

et sous la dépendance d'un promoteur approprié à l'expression dudit immunogène.

25. Utilisation des anticorps monoclonaux ou polyclonaux selon la revendication 24 dans un procédé de diagnostic.

26. Utilisation des anticorps monoclonaux ou polyclonaux selon la revendication 24 dans la fabrication d'une composition thérapeutique.

2717500

1 / 2

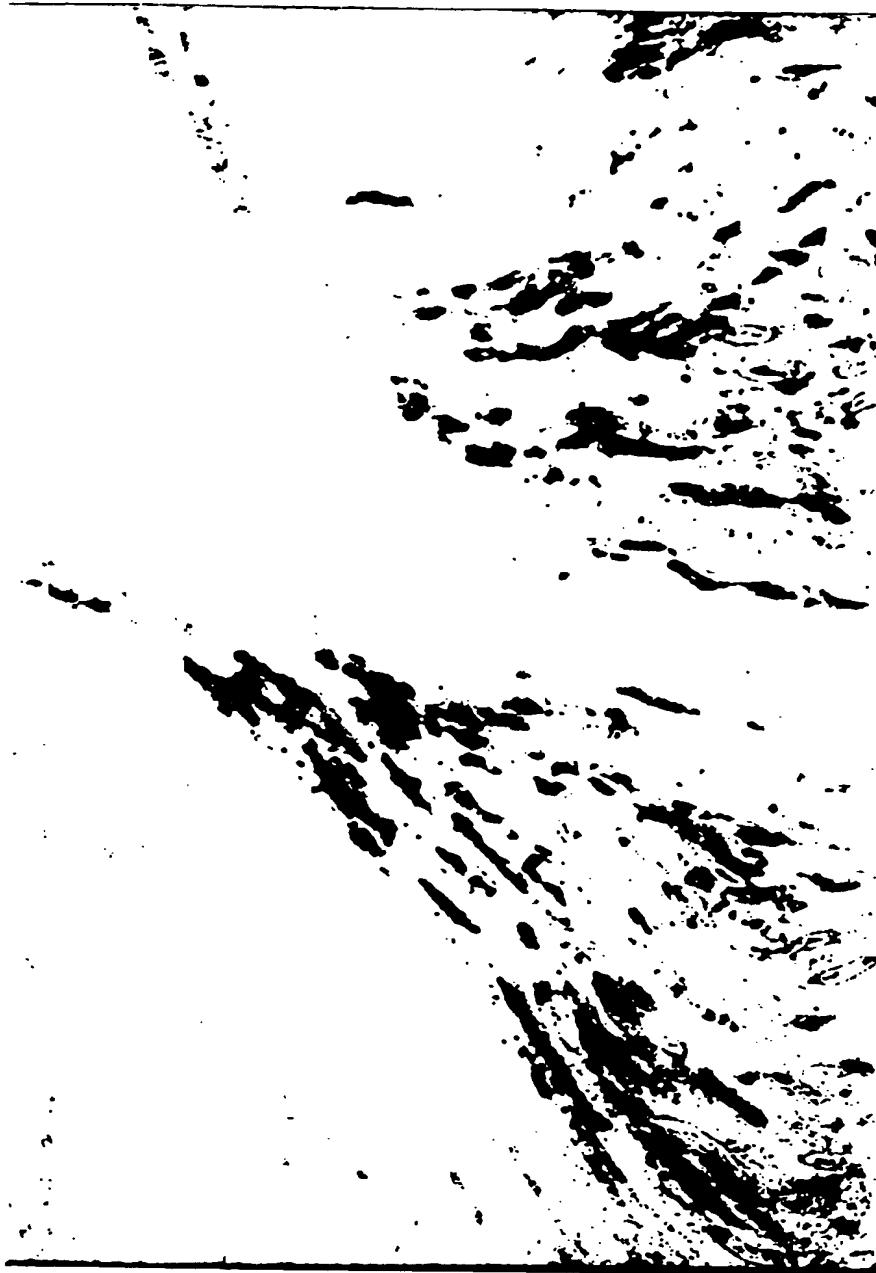


Figure 1a

2717500

2 / 2



Figure 1b

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche2717500  
N° d'enregistrement  
nationalFA 496865  
FR 9403151

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, X	EXP. NEPHROL., vol.1, 1993 pages 49 - 54 RICARDO J. BOSCH ET AL. 'Gene transfer into the mammalian kidney: Direct retrovirus-transduction of regenerating tubular epithelial cells'	18,22
D, A	* abrégé * * page 50, colonne de gauche, alinéa 2 -alinéa 3 * * page 50, colonne de droite, alinéa 2 * * page 51, colonne de droite, alinéa 2 -alinéa 4 * ---	9,10, 12-14,16
D, X	AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 1993 page 468 M. KITAMURA ET AL. 'Gene transfer into the glomerulus via a mesangial cell vector: Site-directed gene delivery, in-situ amplification, and sustained expression of a gene product'	18,22
D, A	* abrégé n. 123P * ---	9,10, 12-14,16
X	WO-A-93 17696 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 16 Septembre 1993	22
A	* page 10, alinéa 2 - page 12, alinéa 2 * * page 13, alinéa 3; revendications 6,31 * -----	9,12,14
DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHÉ (cat.CS)		
C12N A61K C07K G01N C12P A01K		
2	Date d'achèvement de la recherche 15 Novembre 1994	Examinateur Montero Lopez, B
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'exception d'un cas où une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant		
FORM 150/902 (POC/CI)		